

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Marija Posarić
ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Marija Posarić

METODE PRIPRAVE POROZNIH SKELETA ZA
BIOMEDICINSKE PRIMJENE

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Marica Ivanković

Izv. prof. dr. sc. Jelena Macan

Dr. sc. Dajana Milovac

Zagreb, rujan 2015.

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Marici Ivanković i asistentici dr. sc. Anamariji Rogina na neizmjernoj pomoći pri izradi ovog završnog rada.

Zahvaljujem se svojim prijateljima koji su uvijek bili uz mene i olakšali mi studiranje.

I na kraju, posebno se zahvaljujem svojim roditeljima koji su me hrabрили i bili mi podrška tijekom studiranja.

Sažetak

Cilj ovog rada je dati kratki literaturni pregled metoda priprave poroznih skeleta koji se koriste u području inženjerstva tkiva. Inženjerstvo tkiva je interdisciplinarno područje u nastajanju koje primjenjuje načela prirodnih znanosti i inženjerstva za proizvodnju inženjerskog tkiva za popravak i zamjenu oštećenih tkiva i organa.

U inženjerstvu tkiva glavnu ulogu imaju skeleti. Skeleti su trodimenzijske strukture napravljene od bioloških materijala i biomaterijala, koji ispunjavaju osnovne zahtjeve za vezanje i rast stanica. Skeleti napravljeni od polimera, keramike ili kompozita moraju posjedovati specifične karakteristike kao što su visoka poroznost, velika specifična površina, strukturna čvrstoća, specifični trodimenzijski oblik, biokompatibilnost i biorazgradivost.

U radu su izdvojene četiri uspješne metode izrade visoko poroznih polimernih i kompozitnih skeleta: elektropredenje, liofilizacija, ispiranje čestica porogena i toplinski potaknuto razdvajanje faza. Svaka od metoda ima jedinstvene prednosti u proizvodnji skeleta za inženjerstvo tkiva.

Ključne riječi: skelet, inženjerstvo tkiva, poroznost.

Preparation methods of porous scaffolds for biomedical applications

Abstract

The aim of this work is to give a brief literature review of methods for preparing porous scaffolds used in tissue engineering. Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies the principles of life science and engineering to produce engineered tissues for the repair and replacement of damaged tissues or organs.

In tissue engineering, scaffolds play a crucial role. Scaffolds are three-dimensional structures made from biological materials and biomaterials, which fulfil the necessary requirements for cell attachment and growth. Scaffolds made of polymers, ceramics or composites; have to possess specific characteristics such as high porosity, high surface area, three-dimensional shape, biocompatibility and biodegradability.

In this work, four successful methods for highly porous polymer and composite scaffold preparation are pointed out: electrospinning, freeze-drying, particulate leaching and thermally induced phase separation. Each method has unique advantages in the production of scaffolds for tissue engineering.

Keywords: scaffolds, tissue engineering, porosity.

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. INŽENJERSTVO TKIVA.....	3
2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva.....	3
2.2. Koštana biologija.....	4
2.3. Zahtjevi skeleta.....	4
2.3.1. Biokompatibilnost	5
2.3.2. Biološka razgradnja.....	5
2.3.3. Poroznost trodimenzijskih struktura.....	5
2.4. Biomaterijali za inženjerstvo koštanog tkiva.....	6
2.4.1. Metalni biomaterijali	6
2.4.2. Biopolimeri.....	7
2.4.3. Biokeramika	7
2.4.4. Kompozitni materijali.....	8
3. METODE PRIPRAVE POROZNIH SKELETA ZA BIOMEDICINSKE PRIMJENE	9
3.1. Elektropredenje	9
3.1.1. Proces elektropredenja.....	10
3.1.2. Parametri elektropredenja.....	10
3.1.3. Primjena elektropredenja u inženjerstvu tkiva	11
3.2. Liofilizacija	13
3.2.1. Proces liofilizacije	13
3.3. Ispiranje čestica porogena	14
3.4. Toplinski potaknuto razdvajanje faza.....	15
3.4.1. Fazno razdvajanje kapljevina-kapljevina ili krutina-kapljevina.....	16
3.4.2. Parametri metode razdvajanja faza.....	17
4. ZAKLJUČAK.....	18
5. LITERATURA	19
6. ŽIVOTOPIS.....	21

1. UVOD

Ljudsko zdravlje glavni je preduvjet za kvalitetan život. U suvremenom svijetu novonastali uvjeti života i rada često podrazumijevaju različite ozljede ili bolesti koje dovode do strukturalnih oštećenja hrskavice, kostiju i mišića, uzrokujući bol i nesposobnost za rad ljudi na različitim pozicijama širom planete. Te probleme potrebno je riješiti na što bezbolniji, učinkovitiji i dugotrajniji način. U medicini su razvijeni razni načini kojima je moguće nadomjestiti pojedini dio tijela. Današnji sintetski biomaterijali s točno određenim svojstvima za specifičnu primjenu izazivaju revoluciju u istraživanju i u tehnologiji. Uvjet za sve biomaterijale je umanjiti ili potpuno ukloniti svaku vrstu imunološkog odgovora organizma.

Sve se više provode istraživanja matičnih stanica u inženjerstvu tkiva koja otvaraju nove perspektive za liječenje različitih bolesti. Biomaterijali su dizajnirani za postizanje staničnog odgovora na molekulskom nivou, čime se aktiviraju geni koji pomažu obnovi živog tkiva. Istraživanja tih biomaterijala idu u smjeru nove grane biomedicine, tzv. inženjerstva tkiva (eng. *Tissue Engineering*). Inženjerstvo tkiva je najbrže rastuće područje u biomedicinskom inženjerstvu koje nudi golemi potencijal za promjene tradicionalnog pristupa u kliničkom liječenju, odnosno novi terapijski izbor za regeneraciju kosti na prirodan način. Zbog toga su mnoga tkiva i organi dobri kandidati za inženjerske rekonstrukcije (kosti, hrskavice, jetru, gušteraču, kožu, krvne žile i periferne živce) kod kojih inženjerstvo tkiva može pomoći kod kritičnih zdravstvenih potreba koje se odnose na tkiva i zamjenu organa. Osnova ideja je da se kosti sa zamijećenim nepravilnostima zamijene s materijalima za premošćivanje tzv. skeletima, koji trebaju pružiti adekvatnu strukturnu potporu te u kombinaciji s osteogenim (koštanim) ili matičnim stanicama i bioaktivnim molekulama inicirati i aktivno stimulirati regeneraciju nove funkcionalne kosti. Najčešće korišteni materijal u inženjerstvu koštanog tkiva za izradu skeleta je biokeramika, odnosno hidroksiapatit i srodni amorfn i kristalni kalcij fosfati. Uz njih su važni biorazgradivi prirodni ili sintetski polimeri. Za razvoj koštanih skeleta važni su keramički ili polimerni kompoziti, pošto se prirodna kost sastoji od biološkog apatita (kalcijeva fosfata) i kolagena. Zahtjevi za izradu koštanog skeleta obično ne predviđaju upotrebu samo jednog tipa materijala te je time i dizajn keramičkih ili polimernih kompozita izuzetan jer kombinira prednosti bioaktivne keramike i biorazgradivih polimera za ostvarenje fizičkih, mehaničkih i bioloških svojstava koje zadovoljavaju mehaničke i fiziološke zahtjeve domaćina tkiva¹.

Regenerativna medicina je interdisciplinarno područje koje uključuje najsuvremenija postignuća iz područja molekularne i stanične biologije, kemije, kliničke medicine, inženjerstva

i znanosti o materijalima. Osim inženjerstva tkiva, ideja je i samoobnavljanje, gdje tijelo koristi vlastiti sustav, ponekad uz dodatak biološkog materijala, kako bi se stvorile stanice ili obnovili organi.

2. INŽENJERSTVO TKIVA

Inženjerstvo tkiva objedinjuje principe inženjerstva i prirodnih znanosti u cilju razvoja i dobivanja bioloških nadomjestaka koji zadržavaju ili poboljšavaju funkciju tkiva ili organa. Jedan od većih problema suvremene medicine je gubitak tkiva ili oštećenje organa uzrokovano bolešću ili nezgodama. Stoga je cilj inženjerstva tkiva oponašati funkciju prirodnog tkiva. Istraživanja u ovom području sve su značajnija, a potreba za takvim pristupom liječenja javlja se ponajprije zbog ograničene mogućnosti dobivanja organa od donora. Štoviše, nadomjestci su ograničeni u primjeni, mnoga tkiva nije moguće obnoviti zbog oštećenja izazvanih bolešću ili nesrećama, a tkiva koja se spontano obnavljaju nije moguće obnoviti u slučaju značajnih oštećenja. Osim što navedeni nedostaci trenutnih postupaka upućuju na potrebu za tkivnim inženjerstvom, velika je i socijalno-ekonomska korist te primjene. Postignuća primjene tkivnog inženjerstva uključuju umjetnu kožu, zamjenu hrskavica, zacjeljivanje kostiju te krvnih žila, a ciljevi koji se postavljaju za daljnja istraživanja su i razvijanje srčanih zalistaka, tkivno inženjerstvo složenih sustava, kao i dobivanje cijelih organa (jetra, bubrezi). Kao i kod svih novih tehnologija potrebno je međutim uzeti u obzir važna etička pitanja poput eksperimenata na životinjama, stvaranje ljudskog embrija i njegovog uništenja u svrhu istraživanja, primjene ljudskih embrionalnih matičnih stanica te primjenu genetičkog inženjerstva².

2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva

Područje inženjerstva koštanog tkiva u usponu je posljednjih trideset godina. Ono zahtijeva zajedničku suradnju znanstvenika, inženjera i kirurga kako bi se postigao krajnji cilj stvaranja koštanih graftova (nadomjestaka) koji poboljšavaju regeneraciju i popravak kostiju. Glavni elementi u tkivu, na kojima se temelje istraživanja, su izvanstanična matrica (eng. *Extracellular matrix, ECM*), stanice i molekularni signali te oni trebaju poticati popravak i obnavljanje oštećenih dijelova. Kako bi se kosti uspješno obnovile ili popravile vrlo je bitno poznavanje biologije kostiju i njihovog razvoja. Inženjerstvo koštanog tkiva zahtijeva da se novoobnovljena kost u potpunosti integrira sa susjednim tkivom te da obavlja funkcije autohtone kosti².

2.2. Koštana biologija

Kostur, koji je potporanj tijelu, kompleksan je niz pojedinačnih kostiju posebne strukture i sastava ovisno o specifičnom obliku i funkciji. U tijelu odrasla čovjeka nalazi se 206 različitih kostiju, a u tijelu dojenčadi 300 do 350 kostiju. Kost je jedinstven materijal zanimljivih fizičkih i mehaničkih svojstava. Posjeduje sposobnost obavljanja širokog spektra funkcija i reagira na razne metaboličke, fizičke i endokrine podražaje. Posjeduje višefunkcionalna svojstva koja uključuju temelj ljudskog kretanja, podršku strukturi, zaštitu organa u tjelesnim šupljinama te održavanje homeostaze ključnih elektrolita (stalnih fizioloških uvjeta) skladištenjem kalcijevih i fosfatnih iona. Može podnijeti težak teret, izdržati velike sile i savijati se bez loma do određene granice. Većina kostiju ima relativno gust vanjski sloj, poznat kao kortikalna ili gusta kost, koji okružuje manje gusti i porozni dio, trabekularnu ili poroznu kost, iznutra ispunjenu želatinoznim tkivom, odnosno koštanom srži. Kost je vezivno tkivo koje se sastoji od specifičnih stanica: osteoblasta koji sudjeluju u stvaranju izvanstanične tvari (proizvodnja kolagenih vlakana s mineraliziranom tvari), osteocita (osteoblasta zarobljenih unutar praznina) i osteoklasta koji su značajni u razgradnji izvanstanične tvari radi oslobođenja prostora osteoblastima za stvaranje nove koštane tvari³.

2.3. Zahtjevi skeleta

Biološka tkiva sastoje se od stanica, signalizacijskog sustava i izvanstanične matrice. Izvanstanična matrica je trodimenzijski molekularni kompleks sastavljen od kolagena, elastina i laminina⁴. U želji za obnovom tkiva, tj. vraćanjem funkcije, inženjerstvo koštanog tkiva razvija skelete koji stvaraju sintetski mikro-okoliš pružajući trodimenzijsku potporu kako bi se kontroliralo i usmjeravalo stanično ponašanje i promicale stanične interakcije. Odgovarajući trodimenzijski nosač važna je komponenta za inženjerstvo tkiva, kao i niz svojstava koja skelet čine pogodnim za primjenu. Osim što je važan izbor odgovarajućeg materijala, od izuzetne važnosti su i makro- i mikro-svojstva materijala i raznovrsni zahtjevi skeleta. Glavni zahtjevi su: biokompatibilnost, biološka razgradnja, međusobna povezanost pora trodimenzijske strukture, dobra mehanička svojstva, osteoindukcija (interakcije s koštanim stanicama), osteoprovodnost (stvaranje novog koštanog tkiva) i biološka aktivnost, svojstva površine te tehnologija proizvodnje i sterilizacija⁵.

2.3.1. Biokompatibilnost

Biokompatibilnost je svojstvo materijala da bude prihvaćen od strane živog organizma u koji se ugrađuje i ispunjava namjenu za koju je predviđen. Površinska kompatibilnost podrazumijeva kemijsku, fizikalnu i biološku podudarnost nadomjestka i tkiva domaćina, dok je za strukturnu kompatibilnost potrebna dobra prilagodba nadomjestka mehaničkom ponašanju tkiva domaćina. Za optimalnu interakciju između biomaterijala i tkiva potrebne su i površinska i strukturna kompatibilnost. Idealno biokompatibilan materijal ne smije imati iritirajuće, toksično, kancerogeno ili alergijsko svojstvo na živi organizam. Biokompatibilnost materijala ovisi o kemijskoj i fizikalnoj prirodi komponenti od kojih se sastoji, o vrsti i o lokalizaciji tkiva na koja će se primijeniti, trajanju izloženosti i površinskim karakteristikama materijala. Najčešće se definira praćenjem svojstava materijala, odnosno određivanjem je li materijal zadovoljio postavljene zahtjeve^{6,7}.

2.3.2. Biološka razgradnja

Biološka razgradnja (biodegradacija) je kemijsko razaranje materijala od strane živih organizama koje vodi promjenama fizičkih svojstava. Ukazuje na potrebu postojanja određenih bioloških procesa koji prouzrokuju takve promjene. U inženjerstvu tkiva teži se povratku ili poboljšanju prvotnih funkcija tkiva pomoću biorazgradivih skeleta. Nakon usađivanja, biorazgradivi materijal bi trebao zadržati svoja mehanička svojstva do vremena kad više nije potreban i zatim bi trebao biti apsorbiran i izlučen iz tijela bez zaostalih tragova. Kemijska hidroliza hidrolitički nestabilnog osnovnog lanca najpoželjniji je način (mehanizam) razgradnje polimera. Biorazgradivi sintetski materijali za medicinsku primjenu su poliesteri (poli(mliječna kiselina), PLA; poli(glikolna kiselina), PGA; poli(ϵ -kaprolakton), PCL; poli(orto esteri)) odobreni od FDA (*Food and Drug Administration*)^{7,8,9}.

2.3.3. Poroznost trodimenzijskih struktura

S obzirom na to kako se pojedina tkiva mišićno-koštanog sustava međusobno razlikuju, nemoguće je dizajnirati univerzalni skelet koji bi bio pogodan za sve namjene. Dizajn skeleta ima važan utjecaj u inženjerstvu koštanog tkiva i potrebno ga je prilagoditi biološkim i

strukturnim karakteristikama tkiva koje se regenerira. Skelet mora posjedovati visoko poroznu strukturu (poroznost do 90 %) s otvorenim međusobno povezanim porama. Poroznost i međupovezanost pora važni su za ravnomjerno raspoređivanje stanica unutar samoga skeleta te kako bi se nesmetano mogla odvijati difuzija hranjivih tvari, plinova i metaboličkog otpada. Vrlo je važna veličina pora koje moraju biti dovoljno velike da omoguće migraciju stanica unutar strukture, ali i dovoljno male da se uspostavi dovoljno velika specifična površina. Minimalna veličina pora je oko 100 μm , ali se preporučuju pore veće od 300 μm ⁴.

2.4. Biomaterijali za inženjerstvo koštanog tkiva

Pri izradi skeleta za inženjerstvo koštanog tkiva izbor biomaterijala je od presudne važnosti. Biomaterijali su sintetski ili prirodni materijali koji omogućuju svoju primjenu u dodiru s biološkim sustavima. Prvenstveno se koriste za medicinske namjene kao zamjena ili nadogradnja strukturnih komponenata ljudskog organizma kako bi se nadomjestila oštećenja do kojih dolazi zbog starenja, bolesti ili nesretnih slučajeva. Ugrađeni u medicinsko pomagalo postaju dio tkiva ili organa. Koriste se i za uzgoj živih stanica, ispitivanje proteina u kliničkim istraživanjima, genskim istraživanjima, izradi opreme za biotehnološke namjene i drugo. Najvažnija karakteristika im je biokompatibilnost, tj. sposobnost materijala da odgovori na željeni način prilikom primjene. Biomaterijali su materijali ili kombinacije materijala, sintetski ili prirodni, koji se koriste za popravak, zamjenu ili kao model za dio tkiva i organa *in vitro* i *in vivo*. Dije se u četiri glavne skupine: polimeri, metali, keramika (uključujući staklokeramiku i staklo) i prirodni materijali (podrijetlom iz biljaka i životinja)^{8, 9}. Kombinacijom najmanje dvije različite vrste materijala nastaje kompozitni materijal. Veliki izazov pred istraživače postavlja stalna potreba moderne medicine i tehnologije za novim biomaterijalima sa svojstvima za točno određenu upotrebu koja će zadovoljiti vrlo visoke standarde i zahtjeve.

2.4.1. Metalni biomaterijali

Metali se upotrebljavaju kao biomaterijali zbog svoje dobre električne i toplinske provodnosti. Mogu se koristiti kao zamjena za kuk i spojeve u koljenu, kao pločice koje međusobno spajaju frakturirane kosti te kao nadomjestci zubnog korijena. Karakterizira ih

čvrstoća i kovkost, ali su korozivni, posjeduju visoku gustoću te se otežano proizvode zbog čega su rijetko u primjeni u inženjerstvu koštanog tkiva¹⁰.

2.4.2. Biopolimeri

Polimeri su pridonijeli poboljšanju kvalitete života milijuna ljudi širom svijeta. Predstavljaju najznačajniju klasu biomaterijala u medicinskoj primjeni jer mogu biti inertni, kemijski raznoliki, obrađuju se s lakoćom, a neki su i resorbirajući. Obuhvaćaju široki spektar fizičkih i kemijskih svojstava. Mogu se koristiti izravno, u kombinaciji s drugim materijalima ili kao premazi na površinama (primjerice metala). Polimeri dolaze u mnogo različitih oblika: krutina, vlakana, filmova i gelova koji ne pružaju samo potporu već i pravilnu strukturnu podlogu bitnu za regeneraciju tkiva. Kao rezultat, biopolimeri su trenutno materijali koji se koriste u tisuće medicinskih programa. Unatoč značajnom uspjehu koji su pokazali tijekom istraživanja, zamijećeni su i njihovi nedostaci poput mogućnosti odbijanja zbog smanjene biološke aktivnosti. Polimeri imaju slabija mehanička svojstva od kosti, previše su savitljivi i slabi za ispunjavanje mehaničkih zahtjeva materijala za upotrebu u ortopediji. Mehanička svojstva polimera mogu se poboljšati modifikacijom strukture polimera ili dodavanjem vlakana ili punila⁸.

2.4.3. Biokeramika

Najčešća vrsta biokeramike koja se upotrebljava za izradu skeleta su kalcijevi fosfati, poput hidroksiapatita, koji privlače koštane stanice za stvaranje nove kosti. Hidroksiapatit je osnovni mineralni sastojak ljudske kosti. Glavni nedostatak hidroksiapatitnih skeleta su njihova slaba mehanička svojstva, posebice krhkost i niska žilavost. Prema tome, oni se ne mogu upotrebljavati u uvjetima koji uključuju opterećenja. Da bi se prevladali navedeni nedostaci hidroksiapatit se kombinira s fleksibilnim polimerima. Hidroksiapatitna keramika jedini je materijal koji tvori direktnu vezu sa živim koštanim tkivom⁶. Ostali bioaktivni materijali vežu se s domaćinskim tkivom preko karbonatnog hidroksiapatita. Pored kalcijevih fosfata moguće je primijeniti i pojedine silikate. Tako je pseudo-volastonit biokompatibilan i ostekonduktivan bioaktivni materijal koji se može koristiti za zamjenu ili popravak koštanog tkiva na mjestima kod kojih nisu potrebni visoki mehanički zahtjevi. Najveći problem bioaktivne keramike javlja

se tijekom ugradnje bioaktivnog materijala u živi organizam kada postoji površinska interakcija između koštanog tkiva i nadomjestka, dok se ostali dio mase ne mijenja i dolazi do štetnih smičnih naprezanja¹⁰.

2.4.4. Kompozitni materijali

Kompozitni materijali proizvode se spajanjem dvaju ili više materijala različitih svojstava za dobivanje materijala koji posjeduje svojstva koja nisu karakteristična ni za jednu komponentu. Za zamjenu ili popravak oštećenog tkiva i organa koriste se nadomjestci izrađeni od polimera, metala i keramike. Ti materijali su osnova u kompozitu kojoj se pridodaju različiti dodatci. Polimerni kompoziti koriste se u biomedici za umjetne zglobove, nadomjestke i uređaje za popravak lomova kostiju, zamjenu kukova, umjetnu kožu, popravke hrskavice i drugo¹⁰. Kombinacijom polimernih kompozita s hidroksiapatitnom keramikom poboljšava se bioaktivnost materijala. Kompozitni materijali pokazuju najbolja svojstva za primjenu u ljudskom organizmu⁶.

3. METODE PRIPRAVE POROZNIH SKELETA ZA BIOMEDICINSKE PRIMJENE

Ključni zahtjev za adekvatnu primjenu skeleta je visoki nivo kontrole njihovih mikro i makrostrukturnih karakteristika pri procesu izrade. Metode pripreme skeleta odabiru se bez utjecaja na kemijska i biokompatibilna svojstva materijala. Neophodno je da materijal bude proizveden u preciznoj geometriji kako bi se uklapao na mjesto ugradnje, da ima međusobno povezane pore i dovoljno visoku gustoću pora pravilne morfologije, veličine i distribucije. Vrlo je važno znati ograničenja i prednosti pojedinih metoda koje se koriste kako bi se pripravili skeleti pogodni za traženu primjenu¹¹. U inženjerstvu tkiva je razvijeno nekoliko metoda pripreme visoko poroznih skeleta, među kojima se izdvajaju elektropredenje (eng. *electrospinning*), liofilizacija (eng. *freeze-drying*), ispiranje čestica porogena (eng. *solvent casting/particulate leaching*) i toplinski potaknuto razdvajanje faza (eng. *thermally induced phase separation*). Svaka metoda je jedinstvena s određenim prednostima i nedostacima u proizvodnji skeleta za inženjerstvo tkiva.

3.1. Elektropredenje

Elektropredenje je uspješan i jednostavan postupak predenja za proizvodnju visoko porozne i međusobno povezane nanovlaknaste strukture koja oponaša svojstva izvanstanične matrice, a dobivaju se iz polimerne otopine (ili taljevine) pod utjecajem električne sile. Ova metoda omogućuje kontrolu debljine nanovlakana te cjelokupne poroznosti¹². Proizvedena vlakna su tanja (od mikro do nano promjera) i veće aktivne površine od onih dobivenih konvencionalnim procesima predenja. Moguće je elektropredenje sintetskih ili prirodnih polimera, kao i njihovih mješavina, polimera s raznim nanočesticama (metalnim ili keramičkim), aktivnih tvari i dr. Pripraviti se mogu individualna vlakna, kao i lamele sa slučajnim ili planarnim rasporedom vlakana. Konvencionalnim elektropredanjem proizvode se nanovlakna koja su nasumično orijentirana, dok upotreba električnog polja na nabijenu polimernu otopinu omogućuje kontrolu putanje mlaza i proizvodnju orijentiranih nanovlakana koja su korisna za pripremu skeleta za inženjerstvo tkiva. Nanovlaknasti skeleti mogu pružiti stanicama okolišne i fizičke značajke te promicati rast i dobru funkciju stanica. Zbog svoje široke primjene elektropredenje je postalo predmetom mnogih istraživanja, budući da omogućava proizvodnju materijala ciljanih fizikalno-kemijskih svojstava, ovisno o namjeni¹³.

3.1.1. Proces elektropredenja

Uređaj za elektropredenje u osnovi se sastoji od tri glavne komponente: izvora visokog napona (10 – 30 kV), šprice s otopinom i kolektora (uobičajeno metalne ploče). Prije elektropredenja, polimeri su u potpunosti otopljeni u odgovarajućem otapalu. Polimerna otopina (ili taljevina) se zatim uvodi u špricu za elektropredenje. Budući da neke polimerne otopine su neugodnog mirisa ili sadrže štetna otapala- procesi se provode u komorama s ventilacijskim sustavom. Izvor visokog napona se koristi za izbacivanje električno nabijenog mlaza polimerne otopine iz šprice s iglom unutarnjeg promjera od 0,5 do 1,5 mm. Mlaz iz igle izlazi u obliku stošca poznatog kao Taylorov stožac, koji je temelj za mlaz otopine koja putuje prema kolektoru. Oblik baze ovisi o površinskoj napetosti tekućine i o jačini električnog polja. Djelovanjem električnoga polja nabijeni se mlaz ubrzava i stanjuje. U međuvremenu, otapalo u mlazu isparava prije taloženja ili sakupljanja vlakana na uzemljenom kolektoru, što rezultira taloženjem vlakana na kolektoru. Radijalni naboj odbijanja uzrokuje raspršenje mlaza na mnogo malih vlakana približno jednakog promjera i naboja po jedinici dužine^{14, 15, 16}.

3.1.2. Parametri elektropredenja

Tijekom pripreme skeleta vrlo su važni parametri elektropredenja koji se mogu podijeliti na parametre polimerne otopine (viskoznost, molekulska masa polimera, površinska napetost, provodnost, dielektrična konstanta), procesne parametre (jakost primijenjenog električnog polja, brzina protoka, udaljenost između šprice i kolektora, geometrija i sastav kolektora) i parametre okoliša (vlaga, temperatura, strujanje zraka). Svi spomenuti parametri značajno utječu na morfologiju vlakana dobivenih procesom elektropredenja te je pravilnom regulacijom moguće proizvesti nanovlakna željene morfologije i promjera. Vrlo je važno napomenuti da se proces mora provoditi u zatvorenom i kontroliranom okolišu.

Viskoznost otopine je vrlo bitan parametar za veličinu i morfologiju vlakna. Otopine niske viskoznosti proizvode vlakna sa sferama, kapljicama i snopovima, što znači da otapalo nije u potpunosti isparilo te su vlakna još uvijek mokra kada dođu na kolektor. Povećavanjem koncentracije otopine povećava se promjer vlakna i smanjuje stvaranje nepravilnosti. Previsoka viskoznost otopine dovodi do sušenja prvotno stvorene kapljice na vrhu šprice prije stvaranja

mlaza. Optimalnom viskoznosti i koncentracijom dobivaju se kontinuirana glatka vlakna bez prisutnosti sfera ili kapljica.

Molekulska masa polimera ima sličan utjecaj na promjer i morfologiju vlakna kao i viskoznost otopine. Upotreba polimera niže molekulske mase rezultira nižom viskoznosti otopine što za posljedicu ima prisutnost sfera.

Kako pri niskim naponima ne dolazi do procesa elektropredenja, izveden je izraz za kritičan napon pri kojem dolazi do elektropredenja. Kritičan napon ovisi o udaljenosti između izvora (šprice) i kolektora, površinskoj napetosti tekućine, promjeru vrha šprice i duljini igle. Stoga minimalan kritičan napon potreban za izbacivanje mlaza je onaj za savladavanje površinske napetosti otopine. Visoki naponi rezultiraju povećanom količinom dobivenih vlakana. Kada je udaljenost između šprice i kolektora premala vlakna se talože na kolektoru prije isparavanja otapala, što dovodi do stvaranja nepravilnosti vlakana.

Manji protoci daju vlakna manjeg promjera, a previsoki protoci onemogućuju sušenje mlaza i stvaraju nehomogena vlakna.

Veliku ulogu ima vlažnost zraka, a idealna za elektropredenje iznosi 35 %. Vlažnost veća od navedene će otežati konstantnu vrtnju mlaza^{15, 17}.

3.1.3. Primjena elektropredenja u inženjerstvu tkiva

Vlaknasti skeleti s velikim omjerom aktivne površine prema volumenu i visoke poroznosti su najpogodniji za biomedicinsku primjenu. Orijentacija vlakana, veličina i poroznost pora mogu se kontrolirati za željenu namjenu. Mogućnost korištenja različitih polimera u izradi vlakana omogućuje primjenu elektropredenja za regeneraciju raznih tkiva poput kože, krvnih žila, hrskavice, kostiju, mišića, ligamenata i živaca. U zadnjem desetljeću interes za proučavanje strukture nanomaterijala je sve veći, što je i rezultiralo velikom primjenom elektropredenja.

Istraživani su razni sintetski polimeri za pripravu nanovlakana, a neki od njih su: PLA i njeni stereoisomeri (PLLA, PDLA), PGA, kopolimer PLA i PGA poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA).

Prirodni polimeri često se koriste zbog svoje veće biokompatibilnosti i niže toksičnosti. Istraženo je elektropredenje raznih bioloških tvari poput kolagena, svile, proteina fibrinogena i kitozana za biomedicinske primjene. Danas se vlakna proteina fibriona kroz razne procese i površinske modifikacije sve više koriste kao biomaterijali za nove biomedicinske primjene, posebno u području inženjerstva tkiva zahvaljujući njihovoj biokompatibilnosti, sporoj razgradnji i izuzetnim mehaničkim svojstvima te većoj kontroli molekulske strukture i morfologije. Prah fibriona svile se koristi kao tvar za uzgoj i aktivaciju epidermalnih (kožnih) stanica te su nanovlakna dobivena elektropredenjem veoma učinkovita u regeneraciji oštećenog tkiva. Trodimenzijski skeleti fibriona svile imaju posebnu primjenu za kosti, ligamente, hrskavice te u inženjerstvu vezivnih tkiva. Dominantan izvor materijala temeljenih na svili je fibroin proizveden iz gusjenica svilene bube¹⁸.

Kolagen je najzastupljeniji protein u tijelu te se intenzivno koristi za *in vitro* i *in vivo* inženjerstvo tkiva. U mnogim tkivima kolagen tipa I i III su glavni strukturni elementi izvanstanične matrice. Više je različitih tipova kolagena koji se mogu izolirati iz različitih izvora. Funkcija kolagena je da pruža strukturnu potporu tkivu u kojemu je i prisutan te se smatra idealnim materijalom za skelete u području inženjerstva tkiva. Glavni problem elektropredenja kolagena je sastav otapala potrebnog za otapanje kolagena dovoljne koncentracije i otapala za brzo sušenje produkta. Prvi pokušaj elektropredenja kolagena bio je korištenjem kolagena tipa I otopljenog u heksafluoro-2-propanolu. Prevlačenjem kolagena dobivenog elektropredenjem s PCL-om dobivaju se skeleti mehaničkih svojstava sličnih koži¹⁷.

Elektropredenje blok kopolimera vrlo je zanimljivo za modifikaciju polimernih materijala. Postupak elektropredenja vlakana na temelju kopolimera može se poboljšati u usporedbi s homopolimerima pa je tako biopolimer PLGA široko korišten kao elektroispreden skelet za biomedicinsku primjenu. Mehanička svojstva i razgradnja dobivenih vlakana su sasvim drugačija od izvornih homopolimera PGA i PLA. Vlaknaste PLGA nakupine dobivene elektropredenjem imaju poroznost veću od 90 %, stoga je materijal idealan za inženjerstvo tkiva¹⁵.

Elektropredenjem se mogu pripremiti i kompozitni skeleti. U ovom području se provodi uzastopno predenje različitih polimernih otopina i pripremaju se skeleti s naslagama. Svaki se sloj adhezijom može prilagoditi određenoj stanici i potencijalno koristiti za zonske zglobne hrskavice ili popravak arterija. Također se istovremeno mogu presti dvije ili više polimernih

otopina čime se dobivaju skeleti s mješovitim tipovima vlakana. Kompozitni skeleti se mogu pripremiti i tako da se tijekom procesa elektropredenja koriste i ugljikove nanocjevčice kao sredstva za jačanje polimernih vlakana^{15, 17}.

3.2. Liofilizacija

Liofilizacija (sušenje zamrzavanjem) koristi se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, a sve širu primjenu ima za pripremu skeleta u inženjerstvu tkiva. Utvrđeno je da ova metoda ima veliki potencijal za proizvodnju polimernih i kompozitnih čvrstih skeleta. Upotrebom ove metode mogu se pripremiti visoko porozni skeleti (> 90 %) s kontrolom veličine pora. Glavna prednost metode je što ne zahtjeva visoke temperature ili zasebno ispiranje. Međutim, veličina pora je ograničena i vrijeme obrade je duže, što se pak smatra nedostatkom^{19, 20}.

3.2.1. Proces liofilizacije

Liofilizacija podrazumijeva uklanjanje vode iz zamrznutog proizvoda procesom sublimacije. Sublimacija se odvija kada smrznuta tekućina direktno prelazi u plinovito stanje. Priprava liofilizacijom započinje otapanjem polimera u pogodnom otapalu do željene koncentracije. U fazi smrzavanja, materijal u tekućem stanju se hladi do temperature ispod ledišta otapala. Naglim hlađenjem stvaraju se mali kristali otapala, dok kontroliranim oštiri i veliki kristali. Smrzavanje je kritičan korak u liofilizaciji jer se lošom izvedbom mogu narušiti svojstva materijala tijekom smrzavanja. U drugoj fazi, tijekom primarnog sušenja, tlak se spušta do nekoliko milibara, a temperatura se lagano podiže tako da otapalo sublimira. Tijekom prvog sušenja sublimira oko 95 % nevezanog otapala iz materijala. Proces je prilično spor jer bi prebrzim povišenjem temperature moglo doći do promjene strukture materijala koji se suši. U sekundarnom sušenju dolazi do otklanjanja vezanog otapala iz materijala. U ovoj fazi temperatura se podiže iznad 0 °C da bi se prekinule bilo kakve fizikalno-kemijske interakcije koje su se stvorile između molekula otapala i materijala. Kao rezultat, dobije se suhi polimerni skelet s međusobno povezanom poroznom mikrostrukturom. Za razliku od drugih metoda sušenja, sušenje zamrzavanjem je postupak kojim se materijal skrutne prije sušenja te se

uklanjanje velike količine otapala odvija sublimacijom. Ono daje najbolju kvalitetu suhog proizvoda, ali je i najskuplji oblik sušenja zbog duljine trajanja procesa, niske temperature kondenzatora i upotrebe vakuuma. Ova se metoda sušenja koristi za potrebe koje opravdavaju cijenu.

Na svojstva suhog uzorka mogu utjecati procesni parametri metode: temperatura kondenzatora, tlak komore i vrijeme postupka. Osim tih parametara, na svojstva uzorka mogu utjecati i svojstva materijala prije provođenja postupka, sastav, priprava i koncentracija otopine. Tako će viša temperatura i sporije smrzavanje rezultirati manjim brojem velikih kristala otapala i više orijentiranom strukturom u uzorku, dok će naglo smrzavanje i niža temperatura smrzavanja rezultirati velikim brojem malih kristala leda koji nisu orijentirani. Ovom su metodom do danas proizvedeni različiti polimerni i kompozitni skeleti te je i dalje jedna od najčešće korištenih metoda za pripravu visoko poroznih skeleta za inženjerstvo tkiva²¹.

3.3. Ispiranje čestica porogena

Ova metoda priprave trodimenzijskih skeleta je razvijena za kontroliranje međusobne povezanosti i geometrije pora što je vrlo važno za izmjenu hranjivih tvari i otpada kroz porozni skelet. Proces se temelji na umiješavanju čestica porogena u polimernu taljevinu, izlivanju u kalupe te komprimiranjem smjese pod odgovarajućim tlakom. Nakon prestrukturiranja polimera, materijal se vadi iz kalupa, hladi i uranja u odgovarajuće otapalo kako bi se isprao (izlučio) porogen. Metoda daje porozne skelete vanjskog oblika određenog kalupom. Ovaj proces omogućuje nezavisnu kontrolu morfologije i oblika. Mane procesa su mogućnost zaostalog porogena te visoke procesne temperature koje sprječavaju mogućnost pripojenja bioaktivnih molekula.

Metoda priprave ispiranja porogena omogućuje pripravu kompozitnih skeleta PGA, PLA i njihovog kopolimera radi modifikacije biološke razgradnje *in vitro* i *in vivo*. PGA se brzo razgrađuje u vodenim otopinama ili *in vivo* zbog svoje hidrofilne prirode. Za razliku od PGA, PLA gubi mehanički integritet unutar nekoliko mjeseci ili čak godina. Kako bi se postigao srednji stupanj razgradnje između PGA i PLA koriste se različiti omjeri mliječne i glikolne kiseline za sintezu PLGA-a. PLGA skeleti se pripremaju ispiranjem mikrosfernog kompozita PLGA/želatina. Fini PLGA prah se miješa s prethodno prosijanom želatinom i stavlja u teflonski kalup koji se zatim zagrijava iznad temperature staklastog prijelaza polimera. Zatim

se mikrosferni kompozit PLGA/želatina vadi iz kalupa i stavlja u destilirano-deioniziranu vodu. Vodotopljiva želatina se izlučuje ostavljajući porozni PLGA skelet s identičnom geometrijom kao oblik kalupa. Također je moguće konstruirati PLGA skelete bilo kojeg oblika promjenom geometrije kalupa. Poroznost se može kontrolirati promjenom količine želatine, dok se veličina pora skeleta može mijenjati različitim promjerom mikrosfera. Alternativne komponente poput soli i drugih polimernih mikrosfera se mogu koristiti umjesto želatine²².

3.4. Toplinski potaknuto razdvajanje faza

Metoda razdvajanja faza razvijena je s ciljem proizvodnje poroznih skeleta međusobno povezanih pora. Temelji se na promjeni toplinske energije koja potiče razdvajanje homogene polimerne otopine na višefazni sustav. Kada dođe do razdvajanja faza, homogena otopina se razdvaja na fazu bogatu polimerom i fazu bogatu otapalom bilo da dolazi do razdvajanja faza krutina-kapljevina ili kapljevina-kapljevina.

Ovisno o sustavu i uvjetima razdvajanja faza, nakon ekstrakcije otapala mogu se dobiti materijali različite morfologije i karakteristika: materijali otvorenih ili zatvorenih pora, okrugli materijali, prahovi, perle i drugo. Većina istraživanja provedenih za inženjerstvo tkiva zahtjeva skelete s otvorenim porama i dobro povezane morfologije. Jedna od važnih karakteristika u usporedbi s drugim metodama je mogućnost pripreme ne samo intrinzične povezane polimerne mreže, već i međusobnu povezanost poroznog prostora. Stoga je metoda pogodna za pripravu poroznih materijala kao što su skeleti koji se mogu dobiti prilagođavanjem procesnih parametara i svojstva sustava. Mijenjanjem vrste polimera i otapala, koncentracije polimera i temperature razdvajanja faza moguća je priprava različitih tipova poroznih skeleta²³.

Toplinski potaknutim razdvajanjem faza proizvedeni su različiti polimerni skeleti kao što su poliuretani, poli(ϵ -kaprolakton) te polimerne mješavine, kompoziti polimera s nano-hidroksiapatitom, ugljikovim nanocjevčicama i dr. Metoda omogućava kontroliranje veličine pora mijenjanjem uvjeta pripreme te je omogućeni širok raspon oblikovanja skeleta različitih oblika i veličina. Razdvajanjem faza proizvode se nanovlaknaste strukture koje oponašaju prirodnu izvanstaničnu matricu i pružaju bolju funkciju i okruženje za vezanje stanica. Metoda se može jednostavno kombinirati s drugim proizvodnim metodama (ispiranje čestica porogena) za pripravu 3D struktura s kontroliranom veličinom pora ili s metodom brze izrade prototipova za dobivanje nanovlaknastih skeleta za primjenu u inženjerstvu tkiva²⁴.

Metoda se temelji na primjeni toplinske energije kako bi se potaknulo razdvajanje homogene polimerne otopine na dvo- ili višefazni sustav. Kada dođe do razdvajanja, homogena otopina se razdvaja na fazu bogatu polimerom (visoka koncentracija polimera) i fazu siromašnu polimerom (niska koncentracija polimera) bilo da dolazi do izlaganja otopine drugom nemješljivom otapalu ili hlađenja otopine ispod binodalne krivulje topljivosti gdje je prisutno razdvajanje faza kapljevina-kapljevina ili krutina-kapljevina. Otapalo se zatim uklanja liofilizacijom²⁵.

3.4.1. Fazno razdvajanje kapljevina-kapljevina ili krutina-kapljevina

Toplinski potaknuto razdvajanje faza može biti razdvajanjem kapljevina-kapljevina ili krutina-kapljevina. Razdvajanje faza kapljevina-kapljevina pojavljuje se kada se temperatura otopine smanji ispod gornje kritične temperature otopine (eng. *upper critical solution temperature, UCST*). Ispod te temperature smanjuje se topljivost polimera te je otopina usmjerena ka razdvajanju na fazu bogatu polimerom i fazu siromašnu polimerom (tj. otapalo). Raspodjela svake faze ovisi o koncentraciji polimera u otopini. Tako su pri niskim koncentracijama polimera, polimerne kapljice raspršene u matrici otapala, ostavljajući polimerni prah nakon uklanjanja otapala. Pri visokim koncentracijama polimera stvaraju se zatvorene pore nakon uklanjanja otapala.

Razdvajanje faza krutina-kapljevina odvija se ako je temperatura kristalizacija otapala viša od temperature razdvajanja faza kapljevina-kapljevina. Konačna struktura ovisi o prirodi procesa skrutnjavanja: kristalizacije polimera ili smrzavanja otapala te o prijelazima kod razdvajanja faza kapljevina-kapljevina.

Nakon razdvajanja faza (kapljevina-kapljevina ili krutina-kapljevina) otapalo se mora ukloniti iz skeleta kako bi se dobila porozna struktura. Uklanjanje otapala odvija se na temperaturi ispod temperature skrutnjavanja otapala kako bi se izbjeglo ponovno otapanje polimera. Taj korak najčešće se provodi sušenjem zamrzavanjem. Tijekom tog procesa, mješavina odvojenih faza se održava pri niskim temperaturama i tlakovima radi sublimacije otapala. Alternativno se otapalo može ukloniti namakanjem otapala u smjesi tvari koja otapa otapalo, ali ne i polimer. Ta metoda zove se ekstrakcija smrzavanjem (eng. *freeze-gelation*)^{23, 24, 25, 26}.

3.4.2. Parametri metode razdvajanja faza

Parametri procesa i sastav otopine imaju veliki utjecaj na morfologiju dobivene porozne strukture. Na fazni dijagram sustava utječu koncentracija polimera, metoda hlađenja, vrijeme, omjer otapalo/neotapalo te površinski aktivne tvari koje mogu smanjiti površinsku napetost između faza i povećati veličinu pora i međusobnu povezanost. Naglo hlađenje (eng. *quenching*) na niske temperature smanjuje veličinu pora zbog pojave nukleacije, dok pri višim temperaturama dolazi do stvaranja većih pora zbog postojanja manjeg broja jezgara i raširenosti rasta i srastanja razdvojenih faza. Brzina hlađenja i temperatura pri kojoj se uklanja otapalo utječu i na veličinu pora. Koncentracija polimera utječe na gustoću, stoga i na ukupnu poroznost strukture. Kristalasti polimeri teže ka stvaranju više porozne strukture od amorfni polimera zbog većeg skupljanja semikristalne faze tijekom skrutnjavanja. Za molekulsku masu polimera utvrđeno je da nema značajniji utjecaj na ukupnu morfologiju pora.

Tijekom pripreme PLA skeleta razdvajanjem faza često se kao otapalo koristi 1,4-dioksan. Otapalo je vrlo pogodno za taj proces jer ima nisku točku taljenja i visoko vrelište, a to omogućuje toplinski potaknuto razdvajanje faza na visokim temperaturama te olakšava sublimaciju. No, upotreba dioksana u inženjerstvu tkiva nije poželjna zbog toksičnosti i potencijalne kancerogenosti, stoga se kao alternativno otapalo koristi dimetilkarbonat. U nekim se slučajevima dodaje mala količina vode da se potakne razdvajanje faza. Odgovarajuće razdvajanje faza kapljevina-kapljevina vrlo je važno za pripravu nanovlakana i ne javlja se u svim otapalima. Stoga su izbor otapala i temperatura razdvajanja faza ključni za stvaranje nanovlakana. Kada su uvjeti povoljni, razdvajanjem faza kapljevina-kapljevina proizvode se trodimenzijske vlaknaste strukture nanoveličine slične kolegenu tipa I. Također je zapaženo da razdvajanjem faza kapljevina-kapljevina nastaje izotropni PLA oblik s međusobno povezanim porama promjera od 1 do 10 μm , a razdvajanjem krutina-kapljevina anizotropni oblik s morfologijom nalik na ploče. Kontroliranjem stvaranja krupno zrnatih čestica u kasnijoj fazi toplinski induciranog razdvajanja faza mogu se dobiti skeleti makroporozne otvorene strukture s promjerom pora iznad 100 μm ^{24, 26}.

4. ZAKLJUČAK

Inženjerstvo tkiva je multidisciplinarno područje koje doprinosi povećanju znanja u inženjerskom području te u medicini i biologiji, a primijenjena znanja i vještine doprinose ljudskom zdravlju u dijagnostici, terapiji, skrbi i rehabilitaciji. U te svrhe koristi se kombinacija živih stanica, različitih biokompatibilnih materijala, te niz faktora kako bi postigao željeni rezultat. Jedna od važnih komponenta za inženjerstvo tkiva je trodimenzijski skelet s određenim fizičkim, mehaničkim i biološkim svojstvima. Zbog svoje složenosti i značaja za sam organizam, posebno zanimljiva tema je regeneracija kosti i hrskavice zasnovana na poroznim skeletima. Također, razvijaju se i metode priprave poroznih skeleta.

Pri izradi skeleta za inženjerstvo tkiva izbor biomaterijala je od velike važnosti. Biomaterijali se koriste za medicinske namjene kao zamjena ili nadogradnja strukturnih komponenata ljudskog organizma kako bi se nadomjestila razna oštećenja. Najvažnija karakteristika im je biokompatibilnost. Veliki izazov pred istraživače postavlja stalna potreba moderne medicine i tehnologije za novim biomaterijalima sa svojstvima za točno određenu upotrebu koja će zadovoljiti vrlo visoke standarde i zahtjeve.

Raznovrsni su zahtjevi skeleta koji ga čine odgovarajućim trodimenzijskim nosačem pogodnim za primjenu. Kako niti jedan materijal ne može zadovoljiti sve uvjete koji su potrebni, upotrebljavaju se i razvijaju kompozitni materijali koji pokazuju najbolja svojstva za primjenu u ljudskom organizmu.

Elektropredenje, liofilizacija, ispiranje čestica porogena i toplinski potaknuto razdvajanje faza su metode koje su se pokazale kao dobre u području inženjerstva tkiva. Svaka od metoda ima jedinstvene prednosti u proizvodnji skeleta za inženjerstvo tkiva. Daljnja istraživanja usmjerena su ka što uspješnijem rješavanju mnogih medicinskih problema vezanih za gubitak tkiva ili oštećenje organa.

5. LITERATURA

1. Blitterswijk, V., De Boer, J., *Tissue Engineering*, 2nd edition, Elsevier Inc. USA, 2014.
2. Gaurina Srček, V., *Tkivno inženjerstvo*, 2015. (predavanje, PBF)
3. Amini, A. R., Laurencin, C. T., Nukavarapu, S. P., *Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges*, Crit Rev Biomed Eng., 40 (2012) 363–408.
4. Salgado, A. J., Coutinho, O. P., Reis, R. L., *Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends*, 4 (2004) 743-765.
5. Appasani, K., Appasani, R. K., *Stem Cells and Regenerative Medicine: From Molecular Embryology to Tissue Engineering*, Humana Press, USA, 2011.
6. Orlić, S., *Biomaterijali*, 2015. (predavanje, FKIT)
7. Grupa autora, *Biomaterijali*, Institut tehničkih nauka srpske akademije nauka i umetnosti, Beograd, 2010.
8. Vidović, E., *Biomaterijali*, 2015. (predavanje, FKIT)
9. Vidović, E., *(Bio)degradacija biomaterijala*, 2015. (predavanje, FKIT)
10. Brkić, S., *Primjena polimernih kompozita u kirurgiji*, FKIT, 34 (2013) 21-23.
11. Sultana, N., *Biodegradable Polymer-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering*, Springer, 2013.
12. Pejnović, N., Zdraveva, E., Bogadi-Šare, A., *Zaštita na radu u laboratoriju za elektropredenje: Sigurnost*, TTF, 53 (2011) 43 – 50.
13. Kurecic, M., *Electrospinning Nanofibre Production Method*, Tekstilec, 56 (2012) 4-12.
14. Papenburg, B., *Design Strategies for Tissue Engineering Scaffolds*, Gildeprint Drukkerijen, 4 (2009) 1-65.
15. Hasan, M., Alam, M., Nayem, K. A., *Application of Electrospinning techniques for the production of tissue Engineering Scaffolds: A review*, European Scientific Journal, 10 (2014) 265-274.
16. Liu, H., Ding, X., Zhou, G., Li, P., Wei, X., Fan, Y., *Electrospinning of Nanofibers for Tissue Engineering Applications*, Hindawi Publishing Corporation, 11 (2013) 1-8.
17. Pham, Q. P., Sharma, U., Mikos, A. G., *Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review*, Mary Ann Liebert, Inc, 12 (2006) 1197-1208.
18. http://www.researchgate.net/publication/257427775_Biopolimeri (pristup 20. lipnja 2015.)
19. Sultana, N., Wang, M., *Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds Using the Emulsion Freezing/Freeze-drying Technique and Characteristics of the Scaffolds*, Scrivener Publishing LLC, 4 (2012) 63-88.

20. Subia, B., Kundu, J., Kundu, S. C., *Biomaterial Scaffold fabrication techniques for Potential Tissue Engineering applications*, Indian Institute of Technology, 7 (2010) 141-152.
21. Haaparanta, A. M., *Highly Porous Freeze-Dried Composite Scaffolds for Cartilage and Osteochondral Tissue Engineering*, Tampere, 1290 (2015) 1-86.
22. Zhu, N., Chen, X., *Biofabrication of Tissue Scaffolds*, InTech, 12 (2013) 315-324.
23. Martinez-Perez, C. A., Olivas-Armendariz, I., Castro-Carmona, J. S., Garcia-Casillas, P. E., *Scaffolds for Tissue Engineering Via Thermally Induced Phase Separation*, UACJ, 13 (2011) 275-290.
24. Ferrer, C. H., *Development and Characterisation of Completely Degradable Composite Tissue Engineering Scaffolds*, 3 (2007) 75-119.
25. Chen, G., Ushida, T., Tateishi T., *Scaffold Design for Tissue Engineering*, Macromolecular Bioscience, Wiley-VCH, 2 (2002) 67-77.
26. Mikos, G., Temenoff, J. S., *Formation of highly porous biodegradable Scaffolds for Tissue Engineering*, Electronic Journal of Biotechnology, 3 (2000) 1-4.

6. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 29. studenog 1993. godine. Školovanje sam započela 2000. godine u Zagrebu u Osnovnoj školi Vjenceslava Novaka. 2008. godine upisala sam XII. gimnaziju u Zagrebu. Nakon završetka srednje škole, 2012. godine, upisala sam preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.